

氏 名	長安 書博	
学 位 の 種 類	博士 (医 学)	
学 位 記 番 号	第 6269 号	
授 与 報 告 番 号	甲第 3554 号	
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者	
学 位 論 文 名	Up-regulation of MicroRNA miR-30c Induced by High Mobility Group Box 1 in A549 Cells Used as an Alveolar Epithelial Model (A549 細胞、肺胞上皮モデルにおける HMGB1 による microRNA miR-30c 発現増加)	
論文審査委員	主 査	平田一人 教授
	副 査	掛屋弘 教授

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】核内蛋白である High Mobility Group Box-1 (HMGB1) はサイトカインの役割もあり、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの炎症性肺疾患において気道被覆液中の HMGB1 濃度の上昇が知られている。また他方、mRNA 発現量を制御する microRNA と炎症性肺疾患との関連も報告されている。本研究では肺胞上皮モデルである A549 細胞を用い HMGB1 刺激による肺胞上皮細胞の反応や介在する microRNA の COPD 病態への関与を検討した。

【方法】A549 細胞を HMGB1 刺激し、(1) PCR 法および ELISA 法を用い、TNF- α 、MIP2、IL-1 β および MMP-7 の発現を評価した。また、microRNA の let-7d, miR-19a, -30c, -92b, 149, -3116, -1245 発現の変化を RT-PCR によって定量した。(2) PTEN 及び細胞周期およびアポトーシス関連蛋白であるサイクリン A2、プロカスパーゼ 7 発現を Western Blotting 法で比較し、TUNEL 染色にてアポトーシスを確認した。

【結果】(1) HMGB1 刺激により TNF- α 、MIP2 発現が増強しており、3-6 $\mu\text{g/mL}$ の HMGB1 刺激下で HMGB1 シグナル伝達を確認された。培養上清中の MMP-7 も HMGB1 刺激により発現が増加した ($p<0.05$)。RT-PCR では miR-30c の発現増加が確認された ($p<0.05$)。(2) HMGB1 刺激により PTEN、サイクリン A2 は増強し、プロカスパーゼ 7 は減少を認め、TUNEL 染色陽性細胞の増加を認めた。

【結論】3-6 $\mu\text{g/mL}$ HMGB1 刺激下では肺胞上皮細胞内の AGER や TLR 経路へのシグナル伝達を確認され、HMGB1 は細胞周期の亢進およびアポトーシスを含む細胞死との関連が示唆された。本モデルは COPD の気道炎症及び気腫化のモデルになりうると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

核内蛋白である High Mobility Group Box-1 (HMGB1) はサイトカインの役割もあり、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの炎症性肺疾患において気道被覆液中の HMGB1 濃度の上昇が知られている。また他方、mRNA 発現量を制御する microRNA と炎症性肺疾患との関連も報告されている。本研究では肺胞上皮モデルである A549 細胞を用い HMGB1 刺激による肺胞上皮細胞の反応や介在する microRNA の COPD などの病態への関与を検討した。

In vitro 肺胞上皮モデルとして一般的である A549 細胞を HMGB1 刺激し、(1) PCR 法および ELISA 法を用い、TNF- α 、MIP2、IL-1 β および MMP-7 の発現を評価した。また、microRNA の let-7d, miR-19a, -30c, -92b, 149, -3116, -1245 発現の変化を RT-PCR によって定量した。(2) PTEN さらには細胞周期およびアポトーシス関連蛋白であるサイクリン A2、プロカスパーゼ 7 発現を Western Blotting 法で比較し、TUNEL 染色にてアポトーシスを確認した。

その結果、(1) HMGB1 刺激により TNF- α 、MIP2 発現が増強しており、3-6 $\mu\text{g/mL}$ の HMGB1 刺激下で HMGB1 シグナル伝達を確認された。培養上清中の MMP-7 も HMGB1 刺激により発現が増加した ($p<0.05$)。RT-PCR では miR-30c の発現増加が確認された ($p<0.05$)。(2) HMGB1 刺激により PTEN、サイクリン A2 は増強し、プロカスパーゼ 7 は減少を認め、TUNEL 染色陽性細胞の増加を

認めた。

これらの結果から本研究では、3-6 μ g/mL HMGB1 刺激下では肺胞上皮細胞内の AGER や TLR 経路へのシグナル伝達を確認され、HMGB1 は細胞周期の亢進およびアポトーシスを含む細胞死との関連が示唆された。

以上のことから本研究は COPD などの気道炎症及び気腫化の *in vitro* モデルになりうると同時に炎症性肺疾患の病態の一因の解明に貢献するものと考えられる。従って、本研究は博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定された。